

BASE SEQUENCE FOR DETECTING BACTERIA BELONGING TO LACTOBACILLUS AND PEDIOCOCCUS, AND METHOD FOR DETECTING THE SAME BACTERIA

Publication number: JP2002034578

Publication date: 2002-02-05

Inventor: YASUHARA TAKAOMI; TAKAHASHI KYOKO;
MOTOYAMA YASUAKI

Applicant: ASAHI BREWERIES LTD

Classification:

- international: C12N15/09; C12Q1/68; C12N15/09; C12Q1/68; (IPC1-7); C12N15/09; C12Q1/68; C12R1/24; C12Q1/68; C12R1/25; C12Q1/68; C12R1/225; C12Q1/68; C12R1/01

- european:

Application number: JP20000230241 20000731

Priority number(s): JP20000230241 20000731

[Report a data error here](#)

Abstract of JP2002034578

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an oligonucleotide capable of preferentially hybridizing to bacteria belonging to Lactobacillus and Pediococcus. **SOLUTION:** An oligonucleotide complementary to 23S rRNA or rDNA region of bacteria causing turbidity of beer or hybridizing to the region is disclosed. More particularly, an oligonucleotide containing either oligonucleotide having a continuous eight bases in sequence groups represented by the sequence number 1-82 (refer to the specification) and at least 90% homology to the sequence is disclosed. A method for detecting containing a process making a sample suspected of containing a target bacterium contact to at least one kind of a nucleotide fragment is disclosed.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-34578

(P2002-34578A)

(43)公開日 平成14年2月5日(2002.2.5)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F 1	テ-マコ-ト ⁸ (参考)
C 12 N 15/09	Z NA	C 12 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 12 Q 1/68		(C 12 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
// (C 12 Q 1/68		C 12 R 1:24)	
C 12 R 1:24)		(C 12 Q 1/68	A
(C 12 Q 1/68		C 12 R 1:25)	

審査請求 未請求 請求項の数18 OL (全 25 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000-230241(P2000-230241)

(71)出願人 000000055

アサヒビール株式会社

東京都中央区京橋3丁目7番1号

(22)出願日 平成12年7月31日(2000.7.31)

(72)発明者 安原 貴臣

茨城県北相馬郡守谷町線1-1-21 アサ

ヒビール株式会社酒類研究所内

(72)発明者 高橋 恵子

茨城県北相馬郡守谷町線1-1-21 アサ

ヒビール株式会社酒類研究所内

(74)代理人 100083714

弁理士 舟橋 栄子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ラクトバチルス属菌及びペディオコッカス属菌検出のための塩基配列、およびそれらの菌の検出方法

(57)【要約】

【課題】ラクトバチルス属及びペディオコッカス属と優先的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを提供すること。

【解決手段】ビール混濁菌の23S rRNAまたはrDNAの領域に対して相補的であるか、またはそれにハイブリダイズするオリゴヌクレオチド。詳しくは、配列番号1~82に示す配列群中のいづれか8個の連続したオリゴヌクレオチドを含む配列の少なくとも90%に対して相同的であるオリゴヌクレオチド。標的細菌を含んでいる疑いのあるサンプルを少なくとも1種類のヌクレオチド断片と接触させる工程を含む検出方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】ラクトバチルス ブレビスを選択的に検出するための、ラクトバチルス ブレビスの23S rRNAおよびDNAを標的とする配列であって、配列表の配列番号1～14のうちのいずれかの連続した少なくとも8塩基を有するか少なくとも90%相同であることを特徴とするオリゴヌクレオチドまたは対応する相補鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項2】ラクトバチルス ブレビス及びラクトバチルス スピーシズ ABBC no.74を選択的に検出するための、23S rRNAおよびDNAを標的とする配列であって、配列表の配列番号15、16、17のうちのいずれかの連続した少なくとも8塩基を有するか少なくとも90%相同であることを特徴とするオリゴヌクレオチドまたは対応する相補鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項3】ラクトバチルス スピーシズ ABBC no.74を選択的に検出するための、ラクトバチルス スピーシズ ABBC no.74の23S rRNAおよびDNAを標的とする配列であって、配列表の配列番号18～31のうちのいずれかの連続した少なくとも8塩基を有するか少なくとも90%相同であることを特徴とするオリゴヌクレオチドまたは対応する相補鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項4】ラクトバチルス リンドネリを選択的に検出するための、ラクトバチルス リンドネリの23S rRNAおよびDNAを標的とする配列であって、配列表の配列番号31～48のうちのいずれかの連続した少なくとも8塩基を有するか少なくとも90%相同であることを特徴とするオリゴヌクレオチドまたは対応する相補鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項5】ラクトバチルス プランタラムを選択的に検出するための、ラクトバチルス プランタラムの23S rRNAおよびDNAを標的とする配列であって、配列表の配列番号49～64のうちのいずれかの連続した少なくとも8塩基を有するか少なくとも90%相同であることを特徴とするオリゴヌクレオチドまたは対応する相補鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項6】ラクトバチルス プランタラム及びペディオコッカス ダムノサスを選択的に検出するための、23S rRNAおよびDNAを標的とする配列であって、配列表の配列番号65のうちの連続した少なくとも8塩基を有するか少なくとも90%相同であることを特徴とするオリゴヌクレオチドまたは対応する相補鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項7】ペディオコッカス ダムノサスを選択的に検出するための、ペディオコッカス ダムノサスの23S rRNAおよびDNAを標的とする配列であって、配列表の配列番号67～81のうちのいずれかの連続した少なくとも8塩基を有するか少なくとも90%相同であることを特徴とするオリゴヌクレオチドまたは対応する相補鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項8】ドレーサーで標識されていることを特徴と

する請求項1～7のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項9】固体支持体上に固定化されていることを特徴とする請求項1～7のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項10】ラクトバチルス属あるいはペディオコッカス属の同定と存在の有無を、少なくとも1種の該細菌の核酸を含むまたは含み得るサンプルにおいて決定する方法であって、該サンプルを少なくとも1個のオリゴヌクレオチドプローブと適当なハイブリダイゼーション条件下に接触させ、次いで、該プローブとサンプルの核酸との間のハイブリダイゼーション複合体の形成または形成がないことを自体公知の方法で決定する方法において、該プローブが請求項1～9のいずれか1項に記載のものから選択されるオリゴヌクレオチドであることを特徴とする方法。

【請求項11】請求項10に記載の方法において、ラクトバチルス属あるいはペディオコッカス属の定量を、少なくとも1種の該細菌の核酸を含むまたは含み得るサンプルにおいて決定する方法であって、数的に管理した対照細菌を該サンプル中に意図的に混入させ、ここでのハイブリダイゼーション条件下では該プローブと対照細菌の核酸の間にハイブリダイゼーション複合体形成がないが、乳酸菌の核酸の間にハイブリダイゼーション複合体形成があることを特徴とする方法。

【請求項12】請求項1～7のいずれか1項に記載の塩基配列を一部あるいは全部を含むオリゴヌクレオチドをポリメラーゼ存在下での核酸増幅のためのプライマーとして使用する方法。

【請求項13】請求項12に記載の方法で増幅させた核酸を、電気泳動法および核酸染色法により検出する方法。

【請求項14】配列番号82に示される塩基配列の一部または全部を含むラクトバチルス ブレビスの23S rRNAをコードする遺伝子の遺伝子配列。

【請求項15】配列番号83に示される塩基配列の一部または全部を含むラクトバチルス スピーシズ ABBC no.74の23S rRNAをコードする遺伝子の遺伝子配列。

【請求項16】配列番号84に示される塩基配列の一部または全部を含むラクトバチルス リンドネリの23S rRNAをコードする遺伝子の遺伝子配列。

【請求項17】配列番号85に示される塩基配列の一部または全部を含むラクトバチルス プランタラムの23S rRNAをコードする遺伝子の遺伝子配列。

【請求項18】配列番号86に示される塩基配列の一部または全部を含むペディオコッカス ダムノサス ABBC no.74の23S rRNAをコードする遺伝子の遺伝子配列。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、ラクトバチルス

(*Lactobacillus*) 属菌及びペディオコッカス (*Pediococcus*) 属菌の23S rRNAの遺伝子配列及びその配列を用いた該菌の検出、または該菌の同定、または該菌の定量に関する。

【0002】

【従来の技術】近年のビール生（なま）化への流れは、ビール鮮度という新たな価値観をもたらした。こうした背景から、ビール製造会社にとって、製品製造から出荷までの時間を劇的に短縮するとともに、ビール混濁菌の汚染を迅速に正確に判定する必要性が高まっている。ビール混濁を引き起こす細菌の代表的なものの1つが通性嫌気性菌である乳酸菌である。

【0003】従って、食品業界特にビール業界において使用できる、乳酸菌の迅速かつ選択的検出を可能とするのに十分特異的で感度の高い細菌診断試験法を開発することは重要である。古典的なビール混濁細菌の同定は、形態観察、グラム染色性、カタラーゼ試験などの多くの性状ならびに生化学的試験を行い、最終的に新鮮なビールに単離した細菌を再摂取し、その増殖能の観察を行うことにより決定した。これらの一連の操作は、多くの時間と労力を要すると同時に正確な判定も困難な場合が多かった。また最近では、乳酸菌から核酸を抽出して特定のオリゴヌクレオチドをプライマーあるいはプローブとしてPCR (Polymerase Chain Reaction) (特開平10-210980, 特開平6-141899, 特開平6-113888) あるいはハイブリダイゼーション (特表平8-503620) を行う方法がある。しかし、これらの方法は菌体からの核酸の抽出工程を必要とするうえ、個々の菌体を検出することはできない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の1つの目的は、ビール混濁の原因となる生物のリボソームRNA (rRNA) およびリボソームDNA (rDNA) 中の独特的核酸配列、及びそれに相補的なオリゴヌクレオチドを提供するものである。本発明の別の目的は、特異性、感度および速度を併有する核酸ハイブリダイゼーション下においてアクセス可能とされ得るrRNA及びrDNAの標的領域にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドを提供することである。本発明の別の目的は更に、適当なトレーサーで標識したこれらのオリゴヌクレオチドをプローブとして機能させて、ハイブリダイゼーションを行い、当該細菌個体を選択的に検出同定ならびに定量する方法を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】これら目的を達成するための本発明は、ラクトバチルス属菌およびペディオコッカス属菌の23S rRNAをコードする遺伝子の核酸配列である。また、本発明は、ラクトバチルス属菌およびペディオコッカス属菌を選択的に検出するための、該菌の23S rRNAおよびDNAを標的とする配列であって、配列表の配

列番号にあるいずれかの連続した少なくとも8塩基を有するか少なくとも90%相同であることを特徴とするオリゴヌクレオチドまたは対応する相補鎖オリゴヌクレオチドである。また本発明は、ラクトバチルス属あるいはペディオコッカス属の同定と存在の有無を、少なくとも1種の該細菌の核酸を含むまたは含み得るサンプルにおいて決定する方法において、前記オリゴヌクレオチドのいずれかをプローブとして用いることを特徴とする。

【0006】さらに本発明は、前記ヌクレオチドをポリメラーゼ存在下での核酸増幅のためのプライマーとして使用する方法である。細菌リボソームは5S、16Sおよび23S rRNAと呼ぶ少なくとも3種類のRNA分子を含む。歴史的にこれらの名前は、沈降速度で決定されるRNA分子の大きさに関係している。本発明において、細菌のリボソームr RNAは、標的として使用できる。これを使用する利点の一つは、rRNAが生きている細胞全てに豊富に存在するということである。

【0007】本発明をより詳細に開示する前に、本明細書で使用する種々の用語を下記のように定義する。「オリゴヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチド断片」

は天然の（または所望により修飾された）核酸の情報配列によって特徴づけられ、かつ天然の核酸と同様に、予め定めた条件下で、相補的または実質的に相補的なヌクレオチド断片とハイブリダイズ可能であるヌクレオチド単位の鎖を示す二つの同義用語である。その鎖は天然の核酸とは異なる構造のヌクレオチド単位を含みうる。例えば、オリゴヌクレオチドの構成単位である核酸が天然に存在する核酸に見られるホスホジエステル結合でなく、他のエステル結合、またはアミド結合（一般にPNAと呼ばれる）で結合したものであって、標的領域にハイブリダイズできるものであればよい。オリゴヌクレオチド（または、ヌクレオチド断片）は、例えば、100までのヌクレオチド単位を含みうる。一般には、少なくとも8個のヌクレオチド単位を含み、天然の核酸分子から、または遺伝子組換えによって、または化学合成によって得ることができる。

【0008】「ハイブリダイゼーション」は、適切な条件下で、十分に相補的な配列を有するヌクレオチド断片同士が、安定かつ特異的な水素結合によって結合して二本鎖を形成することと理解される。ハイブリダイゼーションの条件は、「ストリンジンシー」すなわち反応条件の厳しさによって決定される。ハイブリダイゼーションを行うときのストリンジンシーが高いほど、特異性は高い。つまり、適切なハイブリダイゼーション条件とは、特にプローブ／標的二本鎖核酸の塩基組成、ならびに両者の核酸配列の間の不一致度から決定され、ハイブリダイゼーション溶液に存在するイオン種の濃度および種類、変性剤の性質および濃度、またはハイブリダイゼーション温度などのハイブリダイゼーション反応パラメータの関数として表現される。ハイブリダイゼーショ

ン反応を行うときの条件のストリンジンシーは、特に、使用するプローブに依存する。これら全てのデータは周知であり、適切な条件は、通常の技術者の能力の範囲内において、ルーチン実験により各ケースで決定され得る。

【0009】また、「相同である」とは、2個またはそれ以上の核酸配列間の類似の度合いを表すことを意味し、生物間の分類学的な類似度合いを意味するものではない。類似の度合いはパーセンテージで表し、例えば2個の配列間が90%相同であるとは、第1の配列の塩基の90%が第2の配列の塩基と同一にマッチすることを意味する。「プローブ」は、決められた条件下でハイブリダイゼーション特異性を有して、本発明の場合は、rRNA、またはrDNAに含まれるヌクレオチド配列を有する標的核酸とハイブリダイゼーション複合体を形成する、例えば、5～100個のヌクレオチド単位、特に8～35個のヌクレオチド単位を含むヌクレオチド断片である。プローブは、検出、同定、定量目的に使用することができる。例えば、放射性同位体、酵素、特に、色素原性、蛍光性または発光性基質に作用し得る酵素（特に、ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）、色素産生化合物、色素原性、蛍光性もしくは発光性化合物、ヌクレオチド塩基の類似体およびビオチンなどのリガンドから選択されるマーカーによって標識できる。

【0010】「プライマー」は、例えば8～100ヌクレオチド単位を含み、かつ例えはPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）などの增幅法、配列決定プロセス、逆転写法などにおける酵素的重合の開始のための決められた条件下でハイブリダイゼーション特異性を有するオリゴヌクレオチドである。本発明に係るオリゴヌクレオチドは、サンプル中の標的核酸の有無の試験において、公知の全てのハイブリダイゼーション技術、特に「ドットプロット」と呼ばれるフィルター上の点付着の技術（MANIATISら、*Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982*）、「サザンプロット」と呼ばれるDNA分離転写の技術（SOUTHERN E.M., *Mol. Biol.*, 98, 503(1975)）、「ノーザンプロット」と呼ばれるRNA分離転写の技術に従って使用することができる。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明によれば、ラクトバチルス属及びペディオコッカス属と優先的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドが提供される。本発明のオリゴヌクレオチドは、ビールの混濁の原因となる生物の存在を検出するために有用である。本発明の1つは、ビール混濁菌の23S rRNAまたはrDNAの領域に対して相補的であるか、またはそれにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドについてである。詳しくは、配列番号1～81に示す配列群中のいずれか8個の連続したオリゴヌクレオチドを含む配列の少なくとも90%に対して相同的であるオリゴヌクレオチドである。本発明のもう一つは、ラクトバチ

ルス属菌及びペディオコッカス属菌の23S rRNAの遺伝子配列であり、詳しくは配列番号82～86のDNA配列である。

【0012】さらに本発明のもう一つは、ビール混濁細菌の存在を検出するための方法である。この方法は、標的細菌を含んでいる疑いのあるサンプルを少なくとも1種類のヌクレオチド断片と接触させる工程を含む。このヌクレオチド断片は、ビール混濁の原因となる乳酸菌のrRNAまたはrDNAと優先的にハイブリダイズする約8～100塩基を含む。この方法は、ヌクレオチドプローブが標的rRNAまたはrDNAと優先的に結合して複合体を形成するようにハイブリダイゼーション条件を試料に付与し、そして標的生物（1または2以上）の存在を指示するものとして複合体を検出する工程を含む。好ましくは、本ヌクレオチドプローブは配列番号1～81に示す配列群から選択される配列中のいずれか8個の連続したオリゴヌクレオチドを含む配列の少なくとも90%に対して相同的である。本発明のヌクレオチド断片は、ビール及びビール製造途中の半製品または、ビール醸造場や下水などの環境下から採取された試料中のビール混濁生物の特異的検出のためのハイブリダイゼーションアッセイ開発の基礎を提供する。本発明ヌクレオチド断片はまた、ビール混濁菌の存在を確認するための基礎を提供する。

【0013】本発明のプローブの開発に際して最初にとられたステップは特異的核酸プローブに対して、標的とするビール混濁菌の23S rRNA内の特有な領域を同定することであった。これは、23S rRNA内のどの標的領域が、ビール混濁の原因となるラクトバチルス属およびペディオコッカス属に対して特異的であるかを見いだすことであった。そこで、これらの実現のためラクトバチルスプレビス（*Lactobacillus brevis*）、ラクトバチルススピーシズ ABBC no.74（*Lactobacillus species ABBC no.74*）、ラクトバチルス リンドネリ（*Lactobacillus Lindneri*）、ラクトバチルス プランタラム（*Lactobacillus plantarum*）、ペディオコッカス ダムノサス（*Pediococcus damnosus*）の23S rRNAの配列（配列番号82～86）を公知の実験プロトコールにより決定し、他の細菌の23S rRNAの配列と比較した。この結果を基に、上記ラクトバチルス属菌及びペディオコッカス属菌に対して特異的なプローブを配列番号1～81のごとく設計した。

【0014】具体的には、（1）ラクトバチルス プレビスに特異的なプローブが配列番号1～14で、（2）ラクトバチルス プレビス およびラクトバチルス スピーシズ ABBC no.74に特異的なプローブが配列番号15～17であり、（3）ラクトバチルス スピーシズ ABBC no.74に特異的なプローブが配列番号18～31であり、（4）ラクトバチルス リンドネリに特異的なプローブが配列番号32～48であり、（5）ラクトバチルス プランタラムに特異的なプローブが配列番号49～64であり、（6）ラクトバチルス プランタラムおよびペディオコ

ッカス ダムノサスに特異的なプローブが配列番号65であり、(7)ペディオコッカス ダムノサスに特異的なプローブが配列番号66～81である。

【0015】本発明のプローブはfluorescence *in situ* hybridization(以下FISHと略す)に用いることができる。すなわち、ビール及びビール製造途中の半製品または、ビール醸造場や下水などの環境下から採取された試料を、遠心分離またはビール混濁細菌を捕捉可能なメンブレンフィルターで処理し、試料中に存在するかもしれない標的ビール混濁細菌と検出プローブとを適切なハイブリダイゼーション条件下で接触させる。検出プローブは標的細菌内の細胞質内に侵入し、そこに存在する23S rRNA内の標的部位に適切なハイブリダイゼーション条件下でアクセスし、ハイブリダイズする。この際に、検出プローブを、放射性同位元素、蛍光物質、化学発光物質等のトレーサー標識することで特異的なハイブリダイゼーションの現象を適当な手法によってモニタリングすることができる。たとえば、検出プローブが放射性同位元素で標識されている場合にはオートラジオグラフィー等の方法によってアッセイを実施し、蛍光物質で標識されている場合には蛍光顕微鏡やレーザースキャニング技術を用いてアッセイを実施し、化学発光物質で標識されている場合には感光フィルムを用いた解析やCCDカメラを用いたデジタル解析を実施し、標的生物の存在の有無を判定することができる。

【0016】また、上記で定義したオリゴヌクレオチドは公知の方法で耐熱性ポリメラーゼの存在下、ラクトバチルス属菌及びペディオコッカス属菌の23S rDNAもしくは23SrRNAを增幅合成するための特異的プライマーとして使用することができる(PCR, RT-PCRなど)。使用するプライマーの組み合わせと適切な反応プログラムの設定により、目的とする核酸が増幅されるかどうかの結果から標的細菌の存在の有無もまた判定可能である。

【0017】

【実施例】本発明を下記実施例により説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1 FISH法によるビール混濁細菌の検出・同定ビール及びビール製造途中の半製品または、ビール醸造場や下水などの環境下から採取された試料からの細菌の捕集は以下の2つの手法を用いて行った。

【0018】(1) 遠心分離法による捕集

供試サンプル50 mLを遠心チューブに入れ、遠心分離(10,000×g, 10分間, 4°C)を行い、上清液を捨て細菌ペレットを回収後、さらに30 mLのPBS溶液で懸濁し同条件で遠心分離し洗浄を行った。洗浄後、細菌ペレットを1 mLの固定液(50%エタノールを含むPBS)に再懸濁した。これらの細菌液をゼラチンでコーティングしたスライドガラス上に一滴のせ風乾後、50%エタノール液、80%

エタノール液、続いて99%エタノール液中にそれぞれ2分間静置して脱水処理を行い、FISHに供する試験標本とした。FISHに用いるプローブは、5'端をFITC標識した蛍光プローブを使用した。FISHは、50 pmolの蛍光プローブを含むハイブリダイゼーション液(0.9M NaCl, 0.05% SDS, 20mM Tris, 5mM EDTA, 10%ホルムアミド, pH 7.6)20 μLを上述した試験標本に接触させ、高湿度を保ったチャンバー内で44°C、1時間行った。洗浄は、以下の通り行った。46°Cの上述したハイブリダイゼーション液中に20分間、試験標本を静置後、常温の滅菌蒸留水ですすぎ、余分な蛍光プローブを除去した。このハイブリダイゼーションと洗浄を終えた試験標本を風乾後、褪色防止剤(ProLong(登録商標); Molecular Probe社)を滴下して蛍光顕微鏡で観察した。

【0019】(2) メンブレンフィルターによる捕集
供試サンプル50 mLをポリカーボネート製のメンブレンフィルター(直径47 mm, 孔径0.4 μm)で吸引濾過した後、50 mLのPBSで2回洗浄した。続いて10 mLのハイブリダイゼーションバッファー(0.9M NaCl, 0.05% SDS, 20mM Tris, 5mM EDTA, 10%ホルムアミド, pH 7.6)で洗浄し、FISHに供した。FISHは、50 pmolの蛍光プローブを含むハイブリダイゼーション液(0.9M NaCl, 0.05% SDS, 20mM Tris, 5mM EDTA, 10%ホルムアミド, pH 7.6)200 μLをプラスチックシャーレに滴下し、この上に菌体の捕捉されている面が上になるようにフィルターを接触させ、高湿度を保ったチャンバー内で44°C、1時間行った。洗浄は、以下の通り行った。ハイブリダイゼーションの終わったフィルターを吸引濾過装置にセットし、46°Cのハイブリダイゼーションバッファー100 mL、続いて常温のフィルター濾過した滅菌水50 mLを用いて吸引洗浄した。ハイブリダイゼーションと洗浄を終えたメンブレンフィルターを無菌的に風乾後、無蛍光スライドガラス上に細菌捕捉面を上にしてのせ、褪色防止剤(ProLong(登録商標); Molecular Probe社)を滴下し、カバーガラスでフィルターを覆い蛍光顕微鏡で観察した。観察画像を図1に示す。

【0020】FITC標識した特異的プローブを用いてFISH解析を行い、蛍光顕微鏡下で観察するとターゲットとなる菌全体が蛍光を発しているのが見える。例えば、FITC標識した配列番号1の相補鎖プローブを用いて*in situ*ハイブリダイゼーションを行うと、図1に示すようにラクトバチルス ブレビスは蛍光標識されて検出されるが、大腸菌等は検出されない。上述した2つの手法の結果は完全に一致し、FISH法でのプローブの特異性は表1および表2に示す通りであった。

【0021】

【表1】

配列番号	L. brevis	ABBC74	L. lindneri	L. plantarum	P. damnosus	B. subtilis	B. cereus	E. coli
	JCM1059	DSM20690	JCM1149	JCM5886	DSM347	IAW1656	K-12	
1	○		×	×	×	×	×	×
2	○	×	×	×	×	×	×	×
3	○	×	×	×	×	×	×	×
4	○	×	×	×	×	×	×	×
5	○	×	×	×	×	×	×	×
6	○	×	×	×	×	×	×	×
7	○	○	×	×	×	×	×	×
8	○	○	×	×	×	×	×	×
9	○	○	○	○	○	○	○	○
10	○	○	○	○	○	○	○	○
11	○	○	○	○	○	○	○	○
12	○	○	○	○	○	○	○	○
13	○	○	○	○	○	○	○	○
14	○	○	○	○	○	○	○	○
15	○	○	○	○	○	○	○	○
16	○	○	○	○	○	○	○	○
17	○	○	○	○	○	○	○	○
18	○	○	○	○	○	○	○	○
19	○	○	○	○	○	○	○	○
20	×	×	○	○	○	○	○	○
21	×	○	○	○	○	○	○	○
22	×	○	○	○	○	○	○	○
23	×	○	○	○	○	○	○	○
24	×	○	○	○	○	○	○	○
25	×	○	○	○	○	○	○	○
26	×	○	○	○	○	○	○	○
27	×	○	○	○	○	○	○	○
28	×	○	○	○	○	○	○	○
29	×	○	○	○	○	○	○	○
30	×	○	○	○	○	○	○	○
31	×	○	○	○	○	○	○	○
32	×	○	○	○	○	○	○	○
33	×	○	○	○	○	○	○	○
34	×	○	○	○	○	○	○	○
35	×	○	○	○	○	○	○	○
36	×	○	○	○	○	○	○	○
37	×	○	○	○	○	○	○	○
38	×	○	○	○	○	○	○	○
39	×	○	○	○	○	○	○	○
40	×	○	○	○	○	○	○	○
41	×	○	○	○	○	○	○	○
42	×	○	○	○	○	○	○	○
43	×	○	○	○	○	○	○	○
44	×	○	○	○	○	○	○	○
45	×	○	○	○	○	○	○	○
46	×	○	○	○	○	○	○	○
47	×	○	○	○	○	○	○	○
48	×	○	○	○	○	○	○	○
49	×	○	○	○	○	○	○	○
50	×	○	○	○	○	○	○	○
51	×	○	○	○	○	○	○	○
52	×	○	○	○	○	○	○	○
53	×	○	○	○	○	○	○	○

【0022】

【表2】

11

12

【0023】また、複数のプローブを同時に用いる手法もある。例えば、プローブ1とプローブ2を同時にFISH解析に供試すると、プローブ1とプローブ2はそれぞれ23S rRNA内の標的領域が異なるため、加算的にシグナルの増強ができた。このように、本発明によって得たプローブを検出したい標的目標に応じて、組み合わせて用いることは有用であった。

【0024】実施例2 FISH法によるラクトバチルス属菌及びペディオコッカス属菌の定量
試料中のラクトバチルス属菌及びペディオコッカス属菌の定量は下記の通り行った。実施例1のごとく試料中の細菌を捕集する直前に、バクトメーターを用いて直接計数管理した対照細菌を試料中に添加し、FISH解析結果を分析することにより得た。例えば、ラクトバチルス ブレビスに汚染されたビールに対し、直接計数法によって管理した大腸菌 (C個) を混入させ、ラクトバチルス ブレビスの23S rRNAに特異的な配列番号 3に示す蛍光標識プローブを用いて実施例1のごとくFISH解析を行った後、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のDAPIを含む褪色防止剤 (ProLong (登録商標) ; Molecular Probe社) を用いて全細菌を染色した。得られる蛍光画像から、図2のごとくDAPIに染まった菌数 (A) とFITC標識された菌数 (B) を決定し、ビール中に存在したラクトバチルス ブレビスの数を推定できる。すなわち、試験に供したビール中に存在したラクトバチルス ブレビス数 (N) は以下の関係式で表すことができる。

$$[0025] N = B \times C / (A - B)$$

蛍光顕微鏡観察により、蛍光を発しない細胞と発する細胞の比率からラクトバチルス属及びペディオコッカス属を定量できる。例えば、ラクトバチルス ブレビス単独に汚染された試料に 10^7 個の大腸菌を添加して回収した検体に対し、蛍光標識した配列番号3の相補鎖プローブを用いてFISH解析を行った場合、蛍光標識されない大腸菌1000個に対し、蛍光標識された細胞（ラクトバチルス *brevis*）が10個認められると、ラクトバチルス ブレビスはもとの試料中に 10^5 個存在したことになる。

【0026】実施例3 ドットプロットによるラクトバチルス属菌及びペディオコッカス属菌の同定

市販品として入手可能なニトロセルロース、ナイロン、PVDF等のフィルター上に細菌試料から公知の手法により抽出した核酸を固定化した。目的に応じて、プローブはロシュ・ダイアグノスティックス社のDIGオリゴヌクレオチドテイリングキットを用いて標識し、ハイブリダイゼーションに供した。検出は、ロシュ・ダイアグノスティックス社のDIG発光検出キットを用い、その手順書に従ってを行い、最終的にフィルターを適当な時間X線フィルムに露光し、ハイブリダイゼーションシグナルの有無から、ラクトバチルス属菌及びペディオコッカス属菌の同定を行った。ドットプロットの結果を表3および表4に示す。

[0027]

【表3】

配列番号	<i>L. brevis</i> ABBC74	<i>L. lindneri</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>P. damnosus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>
	JCM1059	DSM20690	JCM1149	JCM5886	DSM347	IAM1656	K-12
1	○	×	×	×	×	×	×
2	○	×	×	×	×	×	×
3	○	×	×	×	×	×	×
4	○	×	×	×	×	×	×
5	○	×	×	×	×	×	×
6	○	×	×	×	×	×	×
7	○	×	×	×	×	×	×
8	○	×	×	×	×	×	×
9	○	×	×	×	×	×	×
10	○	×	×	×	×	×	×
11	○	×	×	×	×	×	×
12	○	×	×	×	×	×	×
13	○	×	×	×	×	×	×
14	○	○	○	○	○	○	○
15	○	○	○	○	○	○	○
16	○	○	○	○	○	○	○
17	○	○	○	○	○	○	○
18	○	○	○	○	○	○	○
19	×	×	○	○	○	○	○
20	×	×	○	○	○	○	○
21	×	×	○	○	○	○	○
22	×	×	○	○	○	○	○
23	×	×	○	○	○	○	○
24	×	○	○	○	○	○	○
25	×	○	○	○	○	○	○
26	×	○	○	○	○	○	○
27	×	○	○	○	○	○	○
28	×	○	○	○	○	○	○
29	×	○	○	○	○	○	○
30	×	○	○	○	○	○	○
31	×	○	○	○	○	○	○
32	×	○	○	○	○	○	○
33	×	○	○	○	○	○	○
34	×	○	○	○	○	○	○
35	×	○	○	○	○	○	○
36	×	○	○	○	○	○	○
37	×	○	○	○	○	○	○
38	×	○	○	○	○	○	○
39	×	○	○	○	○	○	○
40	×	○	○	○	○	○	○
41	×	○	○	○	○	○	○
42	×	○	○	○	○	○	○
43	×	○	○	○	○	○	○
44	×	○	○	○	○	○	○
45	×	○	○	○	○	○	○
46	×	○	○	○	○	○	○
47	×	○	○	○	○	○	○
48	×	○	○	○	○	○	○
49	×	○	○	○	○	○	○
50	×	○	○	○	○	○	○
51	×	○	○	○	○	○	○
52	×	○	○	○	○	○	○
53	×	○	○	○	○	○	○

【0028】

【表4】

配列番号	L. brevis	ABBC74	L. lindneri	L. plantarum	P. damnosus	B. subtilis	B. cereus	E. coli
	JCM1059	DSM20690	JCM1149	JCM5886	DSM347	IAM1656	K-12	
54	x	x	x	o	x	x	x	x
55	x	x	x	oo	x	x	x	x
56	x	x	x	oo	x	x	x	x
57	x	x	x	oo	x	x	x	x
58	x	x	x	oo	x	x	x	x
59	x	x	x	oo	△	x	x	x
60	x	△	x	oo	x	x	x	x
61	x	△	x	oo	x	x	x	x
62	x	x	x	oo	x	x	x	x
63	x	x	x	oo	△	x	x	x
64	△	△	x	oo	x	x	x	x
65	x	x	x	oo	o	x	x	x
66	x	x	x	oo	o	x	x	x
67	x	x	x	oo	o	x	x	x
68	x	x	x	oo	o	x	x	x
69	x	x	x	oo	o	x	x	x
70	x	x	x	oo	o	x	x	x
71	x	x	x	oo	o	x	x	x
72	x	x	x	oo	o	x	x	x
73	x	x	x	oo	o	x	x	x
74	x	x	x	oo	o	x	x	x
75	x	x	△	oo	o	x	x	x
76	x	x	△	oo	o	x	x	x
77	x	x	△	oo	o	x	x	x
78	x	x	△	oo	o	x	x	x
79	x	x	x	oo	o	x	x	x
80	x	x	x	oo	o	x	x	x
81	x	x	x	oo	o	x	x	x

【0029】

【配列表】

<110> Asahi Breweries Ltd.

<120> Nucleotide sequences for detecting Lactobacillus and Pediococcus bacteria and the method for detecting these bacteria.

<130> 2000-25P

<160> 82

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Lactobacillus brevis

<400> 1

tcaaggta atcatcggt aagatgatt

29

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Lactobacillus brevis

<400> 2

tctgcctaa cttgactatg

20

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Lactobacillus brevis

<400> 3

gggggtatca ccctctatgc cgagccttcc cagac

35

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Lactobacillus brevis

<400> 4

ctccggtctt tccacacctaa	20
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus brevis	
<400> 5	
tctacatcaa tttactgaaa	20
<210> 6	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus brevis	
<400> 6	
aacacacatt tccaaatcgta tgcacacccat agcctc	36
<210> 7	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus brevis	
<400> 7	
tgtccttagc gataaggatt tgactcatca cca	33
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus brevis	
<400> 8	
attcggtcct cgtcacgcct	20
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus brevis	
<400> 9	
cttcggttat catcaactt g	21
<210> 10	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus brevis	
<400> 10	
ctgagggttg acgatttcac c	21
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus brevis	
<400> 11	
ccttgc当地 taacgtaact	20
<210> 12	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus brevis	
<400> 12	
atcactcgac cttacggctcg aat	23
<210> 13	

19

20

<211> 24	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus brevis	
<400> 13	
aagtccttgc gatcttgctt cgtt	24
<210> 14	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus brevis	
<400> 14	
cgttcaaaca tgattaacta gta	23
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus brevis, Lactobacillus species ABBC no.74	
<400> 15	
tgcggtcgca cttgcgtgca	20
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus brevis, Lactobacillus species ABBC no.74	
<400> 16	
cggatataaa tctgtggcat	20
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus brevis, Lactobacillus species ABBC no.74	
<400> 17	
ggcttcattt ctgggcttcg	20
<210> 18	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus species ABBC no.74	
<400> 18	
ctaagcaata accatcggtt aagatggct	29
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus species ABBC no.74	
<400> 19	
tctgccttta ctttagctatg	20
<210> 20	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus species ABBC no.74	
<400> 20	
ggggctatca ccctctttgg ccaggcttcc caacc	35
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	

<213> Lactobacillus species ABBC no.74
 <400> 21
 ctccgtcttt tcaactaac
 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus species ABBC no.74
 <400> 22
 tctacaccaa catactgaaa
 <210> 23
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus species ABBC no.74
 <400> 23
 aacgcacatt tccaatcgta cgcacggctt agcctc
 <210> 24
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus species ABBC no.74
 <400> 24
 aaccggctg ccagcattt actggtaacc t
 <210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus species ABBC no.74
 <400> 25
 tgccgctgca cttgcgtgca
 <210> 26
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus species ABBC no.74
 <400> 26
 cttcggttac caacaactt g
 <210> 27
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus species ABBC no.74
 <400> 27
 ctgagggtta ttggtttcgt t
 <210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus species ABBC no.74
 <400> 28
 cttgcgtt tagcgtact
 <210> 29
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus species ABBC no.74
 <400> 29

atcacgtgac ctaatggta cat
 <210> 30
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus species ABBC no.74
 <400> 30
 tagtccttac gatcttagctt cacc
 <210> 31
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus species ABBC no.74
 <400> 31
 cggttcaaaca cactttacta gta
 <210> 32
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus lindneri
 <400> 32
 ctacgcagt accagtcatg acactggtc
 <210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus lindneri
 <400> 33
 tctgcctctg cgcaagctag
 <210> 34
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus lindneri
 <400> 34
 gagactatca ctctttggtg cagttccca gc
 <210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus lindneri
 <400> 35
 ctccgccttt tcggcttaac
 <210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus lindneri
 <400> 36
 tctacgc当地 cactataaaa
 <210> 37
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus lindneri
 <400> 37
 aacatatacatt tccatcatgta tgcataactt agcatt
 <210> 38

23
 24
 23
 29
 20
 32
 20
 20
 20
 20
 36

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus lindneri
 <400> 38
 aaccaggta caagcattta
 <210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus lindneri
 <400> 39
 tgccgctggc cgtgaggcca
 <210> 40
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus lindneri
 <400> 40
 gcttcaatta tcaaataactt tt
 <210> 41
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus lindneri
 <400> 41
 ctgagggat tcgattcat t
 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus lindneri
 <400> 42
 ccttgcattgc aactgttaact
 <210> 43
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus lindneri
 <400> 43
 cggacataaa tcagtggat
 <210> 44
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus lindneri
 <400> 44
 atcacgcaac gtagttgcgt
 <210> 45
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus lindneri
 <400> 45
 agtccttgcg gtctgcattc att
 <210> 46
 <211> 23
 <212> DNA

20

20

22

21

20

20

20

23

<213> <i>Lactobacillus lindneri</i>	
<400> 46	
tgttcaaaca taattaacta gta	23
<210> 47	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> <i>Lactobacillus lindneri</i>	
<400> 47	
ttttcgatcc tcatcatcgcc ttgcc	25
<210> 48	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> <i>Lactobacillus lindneri</i>	
<400> 48	
ggcttcattt cgaggctttg	20
<210> 49	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> <i>Lactobacillus plantarum</i>	
<400> 49	
tctagtggta acagttgatt aaaaactgct	29
<210> 50	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> <i>Lactobacillus plantarum</i>	
<400> 50	
tttacctcca actagactat g	21
<210> 51	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> <i>Lactobacillus plantarum</i>	
<400> 51	
ctatcacat ctatggcgga ttttcccaa	30
<210> 52	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> <i>Lactobacillus plantarum</i>	
<400> 52	
ctccgacttt ttagtcttaa	20
<210> 53	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> <i>Lactobacillus plantarum</i>	
<400> 53	
tctataacct cgtaactaaa a	21
<210> 54	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> <i>Lactobacillus plantarum</i>	
<400> 54	

29

gacattctaa tccaacagaa tgcacatctt agcctc
 <210> 55
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus plantarum
 <400> 55
 taaagtgaaa agcatttgac
 <210> 56
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus plantarum
 <400> 56
 ctttcacta tcaagttctt tg
 <210> 57
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus plantarum
 <400> 57
 ctgagagaat ttgatataat c
 <210> 58
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus plantarum
 <400> 58
 cttgcacgg gatcataact
 <210> 59
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus plantarum
 <400> 59
 cgatatgaa tcaatggcat
 <210> 60
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus plantarum
 <400> 60
 atcacgcac ctaatggtcg cat
 <210> 61
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus plantarum
 <400> 61
 aagtcttcac gatttgtt cacc
 <210> 62
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus plantarum
 <400> 62
 tgctcaaacg cacttactag ta
 <210> 63

30

36
 20
 22
 21
 20
 20
 23
 24
 22

<211> 26	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus plantarum	
<400> 63	
tttcgctccc cgtcacagct tgtcct	26
<210> 64	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus plantarum	
<400> 64	
ggcttcaatt ctgagcttcg	20
<210> 65	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus plantarum, Pediococcus damnosus	
<400> 65	
tgcggctgat cttgcgatca	20
<210> 66	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Pediococcus damnosus	
<400> 66	
cgtggcggt aacaacggatt aatgttggtt	29
<210> 67	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Pediococcus damnosus	
<400> 67	
tctacacctca accacgttat g	21
<210> 68	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Pediococcus damnosus	
<400> 68	
ggggctgtcc ccgcctctggc cagtccttc	28
<210> 69	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Pediococcus damnosus	
<400> 69	
gctccgttcc ttcaacttaa	20
<210> 70	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Pediococcus damnosus	
<400> 70	
tctacatctg catactcagt	20
<210> 71	
<211> 35	
<212> DNA	

<213> Pediococcus damnosus	
<400> 71	
ggcacattat ccaactgtgt gctttctta gcctc	35
<210> 72	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Pediococcus damnosus	
<400> 72	
gaaaagataa agcatttac	20
<210> 73	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Pediococcus damnosus	
<400> 73	
gttcggctat gaaaatcttt g	21
<210> 74	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Pediococcus damnosus	
<400> 74	
ctgagggatt ttcattttgc c	21
<210> 75	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Pediococcus damnosus	
<400> 75	
cctggcatgc aaacgttaact	20
<210> 76	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Pediococcus damnosus	
<400> 76	
cggacataaa tcaatggcat	20
<210> 77	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Pediococcus damnosus	
<400> 77	
atcacgcccc cttaggtgg cat	23
<210> 78	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Pediococcus damnosus	
<400> 78	
agtccctcacg gtctgccttc atc	23
<210> 79	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Pediococcus damnosus	
<400> 79	

aaggtaagt ggatgagta gcttcggcga agccccagaaa tgaagccccca gtaaacggcg 1920
gccgtaacta taacggctt aaggttagcga aattccttgt cgggtaagtt ccgacccgca 1980
cgaaaggcgt aacgatctga gcactgtctc aacaagagac tcggtgaat tatagtacct 2040
gtgaagatgc aggttacccg cgacaggacg gaaagacccc atggagcttt actgttagctt 2100
gatattgggt gttgacacaa cttgtacagg ataggtcgga gccgttagagg ccggaacgct 2160
agtttcggca gaggcgttgg tgggatacga cccttgttgcgt gtgaacactc taacccgcac 2220
cacttagcgt ggtgggagac agtgtcagggt gggcagtttgcgttgggatcga cccttgttgcgt 2280
aaaagtaacg gaggcgcacca aagggtccct cagaatggtt ggaaatcatt cgttagatgt 2340
aaaggcagaa gggacttgcgttggcgttgggatcga cccttgttgcgttgggatcga aagtccggct 2400
tagtgatccg gtggtaccgt atgcacggc catcgctcaa cggataaaaag ctaccctggg 2460
gataacagggc ttatctcccc caagagtcca catcgacggg gaggtttggc acctcgatgt 2520
cggtcatcg catcctgggg ctgttagtcgg tcccaagggt tgggctgttc gcccattaaa 2580
gcgggtacggc agctgggttc agaacgtcgt gagacagttc ggtccctatc cgtcgccggc 2640
gttagggaaatt tgagaggagc tggttcttagt acggagaggac cggaaatggac acacccgttgg 2700
tgtatcagtt gtgcggccag gcgcattgttgcgttgggatcga gataaacgct 2760
gaaagcatct aagtgtgaaa gcccattttcgcgttgggatcga atcacactgg cggccgttgg 2820
a 2821

<210> 84

<211> 2937

<212> DNA

<213> *Lactobacillus lindneri*

<400> 84

gagagtatcc tcaggtgagc gagagaactc tcgttaagga actcgccaaa atgacccgt 1740
 aacttcggaa gaaggggtgc tggcctcacg gccagccgca gtgaaaagac tcaaacgact 1800
 gtttatcaaa aacacagggt tatgcaaaaat cgtaagatg agtatatggg ctgacgcctg 1860
 cccggtgctg gaaggtaag tggaaagggt agcttcggca aagcctcgaa atgaagcccc 1920
 agtaaacggc ggccgtact ataacggtcc taaggtagcg aaattcttg tcgggtaagt 1980
 tccgacccgc acgaaaggcg taacgattt agtactgtct caacgagaga ctgggtgaaa 2040
 ttaagatacc tgtgaagaag caggttaccc gcgcacaggac ggaaagaccc catggagctt 2100
 tactgttagct tgatattggg ttttacata gcttgcacag gataggtagg agccatagaa 2160
 gccgaaacgc tagtttcggt ggaggcgta gtgggatact acccttgta tgtgaacact 2220
 ctaaccctga gcacttaacg tgctcgaga cagtgtctgg ttggcagttt gactggggcg 2280
 gtcgcctcct aaatagtaac ggaggcgctc aaaggtttgc tttagatgtt tgaaatcat 2340
 ttgtaaagtg taaaggcaaa agcaagctt acttgcgagc caaacaggctc gaggcaggac 2400
 gaaagtccgaa ctttgtatc cgggtgttacc atatggaaagg gccatcgctc aacggataaa 2460
 agctaccctg gggataacag gcttatctcc cccaagaggat cacatcgacg gggagggttt 2520
 gcaccccgat gtcggctcat cgcatcctgg ggctgttagt ggtcccaagg gttggctgt 2580
 tcgcccatta aagcggtacg cgagctgggt tcagaacgtc gtgagacagt tcggcccta 2640
 tccgtcgccg ggcaggaaaa tttagagagga gctgtcccta gtacgagagg accggatgg 2700
 acataccgcg ggtgtatcg ttgcggccg aggccattt ctgagtagct atgtatggat 2760
 gagataaacg ctgaaagcat ctaagtgtga aactcgccctc aagatgagat ttccattcc 2820
 tatatggaaag taagactcct gaaatgtat caggtcgata ggttagaagt ggaagcatag 2880
 tgatatgtga agcggactaa tactaatagg tcgaggactt gacccaaagc cgaattc 2937

<210> 85

<211> 2940

<212> DNA

<213> Lactobacillus plantarum

<400> 85

gaattccggt taagttaata aaggggccac ggtgaatgcc ttggcaactag gagccgatga 60
 aggacgggac taacaccgt atgttcggg gagctgtacg taagctatga tccggagatt 120
 tccgaatggg gcaacccagc agtttaatc aactgttacc actagatgaa ttcatagtct 180
 agttggaggat aaacgctgtg aactgaaaca tctcattagc agcaggaata taaagaaatt 240
 tcgattccct aagtgcggc gagcgaacgg ggaacagccc aaaccaaagt gcttgcactt 300
 tgggttgtt gactgtaca tttagttac caaaagactt gatagtcgaa ggatttggga 360
 aaatccgcca tagatggtga tagcccgatc gattaaatca aattctctca gttcaggatc 420
 ctgagtagcc cgaaacacgt gaaattccgt cggaatccgg gaggaccatc tcccaaggct 480
 aaatactacc tagtgaccga tagtgaaatc gtaccgtgag ggaaagggtga aaagcaccccc 540
 gggagggggag tgaaatagtt cctgaaacca tggcctaca ataagtcaga ggcgttaat 600
 gcggtatggc gtgccttttg tagaatgaac cggcgatgt tgatccgtg caaggtaag 660
 actaaaaagt cggagccgt gcaaaggcgatgtt ggcgtttga gtacgagggtt 720
 atagaccgcg aaccagggtga cctatccatg tccagggtga aggtgcggta aaacgcactg 780
 gaggaccga cccgtgtaaatc ttggatgatc gtgtggatag cggtaatgg 840
 ccaaacgaac ttggatgatc ctgggtctt cggaaatgc tttagggctt gctcggat 900
 taggatcatg gaggttagac actatggatc ctagggccc gtctgggtt actgaattca 960
 gataaaactcc gaatgccatt gattcatatc cgggagtcg acgtgagtg ataagatcca 1020
 ccgtcggaaatc gggaaacagcc cagaccatca gttaaaggatc ctaaatgtat gctaagtgg 1080
 aaaggatgtg gagttgcata gacaactagg atgtggctc agaaggcagcc accatttaaa 1140
 gagtgctaa tagtcacta gtcgagtgat cctgcgcggaaatgtaccg gggctaaagca 1200
 tactaccgaa accatggatc cgaccattag gtcgcgtat aggagacgt tctaaggccg 1260
 gtgaagcaag atcgtggatc cttgtgaagc gcttggaaatc gagaatgcgt gtatggat 1320
 cggaaatgtatc gttggaaatcc tatccaccgt atgactaagg ttccctggg aaggctcgatc 1380
 ctcccgatgtt tagtcgggac ctaagtgcgt ggcgagggc gtagacgtatc gataacagggt 1440

tgtagattcct gtactagttt agtgcgtttt agcaatggag ggacgcagga ggctaagatg 1500
tgcattctgt tggattagaa tgtccaagca gtaagtcttg tgaagagtca aatgctttc 1560
actttaagga caagctgtga cggggagcga aatttagtag cgaagcgtct gatgtcacac 1620
tgccgagaaa agcttctagt gagtacttaa ctacccgtac cgcaaaccga cacaggttagt 1680
cgaggagaga atcctaaggt gagcggatgtga actctcgtaa aggaactcgg caaaaatgacc 1740
ccgtaacttc gggagaaggg gtgcgtatcg caagatcagc cgcaatgtaat aggcccaggc 1800
gactgtttat caaaaacaca ggtctctgca aaatcgcaag atgacgtata ggggctgacg 1860
cctgcccgtt gcttggaaaggt taaaaggatg gtttagcttc ggcgaagctc agaattgaag 1920
ccccagtaaa cggcgccgt aactataacg gtcctaaggt agcggaaattc cttgtcggtt 1980
aagtccgac ccgcacgaaa ggcgtaaacga tctgggact gtctcaacga gagactcggt 2040
gaaattataat tgcgtgtt gatgcggact accccgcaca ggacggaaag accccatgga 2100
gctttactgt agcttgatat tgagtgttt tacagctgtt acaggatagg taggagccat 2160
agaaaaccgga acgcttagttt cgggtggaggc gttgggtggta tactaccctc gctgtatgac 2220
cactctaacc cgccaccacta atcgtgggtt gagacagtgtt cagggtggca gtttgcgtt 2280
ggcggtcgcc tccctaaaaag taacggaggc gcccaaagggt tccctcagaa tgggtggaaa 2340
tcattcgtag agtgtaaagg cacaagggag cttgactgcg agacagacag gtcgagcagg 2400
gacgaaagtc gggcttagt atccgggtt accgtatgg aggggccatcg ctcaacggat 2460
aaaagctacc ctggggataa caggcttatac tcccccaaga gtccacatcg acgggaagg 2520
ttggcaccc tgcgtggct catcgcatcc tggggctgtt gtcggccca aggggtggc 2580
tgttcgccc ttaaagcggt acgcgagctg gttcagaac gtcgtgagac agttcggtcc 2640
ctatccgtcg cggcgtagg aaatttggaa ggacctgtcc ttagtacgag aggaccggaa 2700
tggacatacc tctgggtgtac cagttgtgcc gccaggcga tcgctgggtt gctacgtatg 2760
gatgtgataa acgctgaaag catctaagt tgaaacacac ctcgagatgg gatttcccat 2820
tcctttatgg aagtaagacc cctgaaagat gtcggatgtt ataggttaga agtggcagt 2880
cggtgcacca tgaagccgac taataactaat aggtcgaggc cttgacccaa agccgaattc 2940
<210> 86

<211> 2942

<212> DNA

<213> *Pediococcus damnosus*

<400> 86

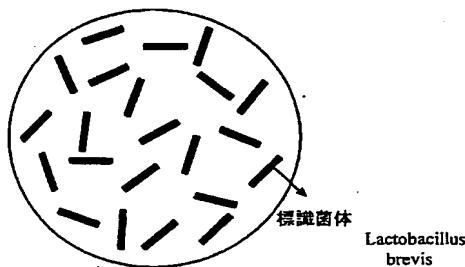
gaattcggt taagtata aaggcgcncc ggtgaatgcc ttggtaactag gagccgatga 60
aggacgggac taacaccgat atgcttcggg gagctgtaa tagctttaa tccggagatt 120
tccgaatggg gaaacccaac aacattaatc cgttgttacc gccacgtaa tacataacgt 180
ggttggaggt agacgtgggg aactgaaaca tctcagttacc cacaggaata gaaagaaaaa 240
tcgattcccc gagtagccgc gagcgaaagg ggaacagccc aaaccaggaa gcttgcgtcc 300
tggggttgtt ggaccgaaca tttgagttac caaagatttt catagccaa cagtctggga 360
agactggcca gagcgggtga cagccccgt a gcaaaatga aaatccctca gttcaggatc 420
ctgagttacgg cgaaacacgt gtaactccgt cggaatccgg gaggaccatc tcccaaggct 480
aaatactccc tagtgaccga tagtgaaacca gtaccgtgag gaaagggtga aaagcacc 540
gaaaggggag tgaaacagtt ctgaaacca t gtcctaca agaagtcaga gcccgttaat 600
gggtgatggc gtgcctttt tagaatgaac cggcgagttt cgttgcgtcc ccaggtaa 660
ttgaagaaac ggagccgtag cgaaagcgag tctgaatagg gcgactgagt atgcagatgt 720
agacccgaaa ccaagtgacc taccatgtc caggttgaag gtgcgttaaa acgcactgga 780
ggaccgaact cgtgtacgtt gaaaagtgtct gagatgaggt gtgggtagcg gtgaaattcc 840
aaacgaactt ggagatagct ggttctctcc gaaatagctt tagggcttagc ctggactta 900
ggatcatgga ggttagagcca ctgtttggac tagggccca tctagggtta ctgaattcag 960
ataaaactccg aatgcatttgc atttatgtcc gggagtctaga cggtgagtga taagatccat 1020
cgtcgaaagg ggaacagccc agaccaccag ttaagggtccc taaaatatagt ttaagtggaa 1080
aaggatgtgg agttgcatac acaacttagga tttggctca gaagcagccca tcattaaag 1140
agtgcgtaat agctcaacttag tcgagtgttacc ctgcgccc gaaatgtaccgg ggcttaaaca 1200

tattaccgag actgtggatg ccaccgtaag gtggcgtat aggagagcgt tctaaggcg 1260
 atgaaggcg accgtgagga ctgttggagc gcttagaagt gagaatccg gtatgagtag 1320
 cggaaagacag gtgagaatcc tggccaccga atgactaagg tttcctgggg aaggctcgtc 1380
 cacccagggt tagtcggac ctaagtcgag gccgagaggc gtagacgatg gataacaggt 1440
 tgagattcct gtactagtt aacttgttt aacaatggag ggacgcagga ggctaagaaa 1500
 agcacacagt tggataagtg tgcccaagca acaagtctta gatagagtt aatgccttat 1560
 cttttcagga caagttgtga tggggagcga aatttaagta gcgaaagttc ttagtcaca 1620
 ctggccgagaa aagcttctag ttagagttt actacccgtt ccgcaaaaccg acacaggt 1680
 tcgaggagag tatttcctcagg tgagcgagag aactctcgtt aaggaattcg gcaaatacgac 1740
 cccgttaactt cggaagaagg ggtgctgatc gcaagatcag ccgcgttga taggcccagg 1800
 cgactgtttt tcaaaaaacac aggttctgc aaaatcgtaa gatgactat agggctgac 1860
 acctgtccccgg tgctggaagg ttaagtgaat gagtttagctt cggcgaagct ttggatgaa 1920
 gccccagtaa acggcggccg taactataac ggtcctaagg tagcgaattt ctttgcggg 1980
 taagttccga cccgcaccaa aggtgttaacg atctggcac tttctcaacg agagactcgg 2040
 tgaattata atacccgtga agatcggtt tacccgcac aggacggaaa gacccatgg 2100
 agctttactg tagcttgcata ttgagtttt gtacaacttg tacaggatag gttaggacccg 2160
 tagacatcgaa aacgcttagtt tcgatggagg cgttgggtt atactaccct cgttgcata 2220
 accctctaacc cccgcggccact aagcggtggcg ggagacagt tcaggttagc agtttactg 2280
 gggcggtcgc ctccctaaaga gtaacggagg cggccaaagg ttccctcaga atgggtggag 2340
 atcatttcgca gagggttaaag gcacaaggaa gcttgcactc gagacagaca ggtcgagcag 2400
 ggacgaaagt cggcgttagt gatccgggtt accgtatgg aagggccatc gctcaacgg 2460
 taaaagctac cctggggata acaggcttat ctcccccag agttcacatc gacggggagg 2520
 tttggcacct cgatgtcgcc tcatcgcatc ctggggctgt agtcggccc aagggttggg 2580
 ctgctcgccc attaaaggcg taacgtggct ggggttcagaa cgtcgtgaga cagttcggtc 2640
 cctatccgtc cgccggcgttag gaaattttagg aggtatctgtc ctttagtacga gaggacccgg 2700
 atggacatac cgctgggtta ccagttgttc cgccaggagc atcgctgggt agtactgtat 2760
 ggatgagata aacgctgaaa gcatctaagt gtgaaactca cctcgagatg agatttccca 2820
 ttccattttt ggaagtaaga cccctgagag atgatcaggat agataggttt ggagtggaaag 2880
 tgttagtgcata catggagcgg accaatacta ataggtcgag gacttgacca aaagccgaat 2940
 tc

【図面の簡単な説明】

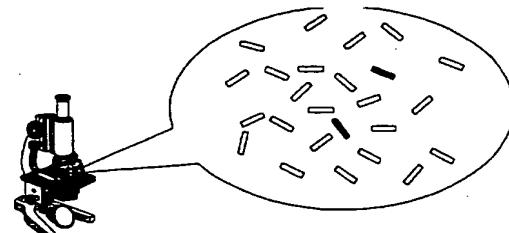
【図1】FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法によるラクトバチルス ブレビスの検出を示す図。

【図1】



【図2】蛍光顕微鏡観察によるラクトバチルス属及びペディオコッカス属の定量を示す図。

【図2】



フロントページの続き

(51) Int.C1. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 R	1:25)	(C 1 2 Q	1/68
(C 1 2 Q	1/68	C 1 2 R	1:225)
C 1 2 R	1:225)	(C 1 2 Q	1/68
(C 1 2 Q	1/68	C 1 2 R	1:01)
C 1 2 R	1:01)	C 1 2 N	15/00
			Z N A A

(72) 発明者 本山 靖朗
茨城県北相馬郡守谷町緑1-1-21 アサ
ヒビール株式会社酒類研究所内

F ターム(参考) 4B024 AA05 AA11 CA01 CA09 CA11
DA05 HA13
4B063 QA01 QQ06 QQ42 QR08 QR56
QR62 QS16 QS25 QS34 QS36
QX02

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002331

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, CA/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Chenoll E. et al., Identification of Carnobacterium, Lactobacillus, Leuconostoc and Pediococcus by rDNA-based techniques. Syst.Appl.Microbiol., 2003, Vol.26, No.4, pages 546 to 556	1 2-11
X A	JP 10-210980 A (Asahi Breweries, Ltd.), 11 August, 1998 (11.08.98), (Family: none)	1 2-11
X A	JP 2003-250557 A (Sapporo Breweries Ltd.), 09 September, 2003 (09.09.03), (Family: none)	1 2-11

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 April, 2005 (26.04.05)Date of mailing of the international search report
17 May, 2005 (17.05.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No:

PCT/JP2005/002331

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Munoz R. et al., Ser-127-to-Leu substitution in the DNA gyrase B subunit of <i>Streptococcus pneumoniae</i> is implicated in novobiocin resistance. <i>J.Bacteriol.</i> , 1995, Vol.177, No.14, pages 4166 to 4170	1 2-11